

氏名	のぎ 禾 てる 晃 かず 和
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第2322号
学位授与の日付	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科化学専攻
学位論文題目	Structural studies of bacterial photosynthetic reaction center: thermostability of membrane protein and electron transfer (細菌型光合成反応中心の結晶構造解析: 膜タンパク質耐熱化機構および電子伝達反応機構)
論文調査委員	(主査) 教授 三木邦夫 教授 伊藤維昭 教授 丸岡啓二

### 論文内容の要旨

紅色細菌の光合成膜においては、光合成反応中心複合体、シトクロム  $b_{61}$  複合体および可溶性電子伝達タンパク質の三成分からなる環状の電子伝達反応が行われている。まず、光捕集タンパク質から太陽光のエネルギーを吸収した光合成反応中心複合体が、その分子内で電荷分離を引き起こし、複合体内の最終電子受容体であるキノンを還元する。複合体から放出されたキノ分子は膜内を移動し、シトクロム  $b_{61}$  複合体へと電子を運ぶ。シトクロム  $b_{61}$  複合体はキノンを酸化し、受け取った電子をさらに可溶性電子伝達タンパク質へと受け渡す。可溶性電子伝達タンパク質はペリプラズムを移動し、光合成反応中心へと電子を運ぶ。これによって光合成反応中心は再び還元され、初期状態へと戻る。一連の電子伝達反応の過程で、膜間に電気化学的プロトン勾配が形成され、このエネルギーを利用して生命活動の源となる ATP が合成される。

可溶性電子伝達タンパク質は、 $c$ 型のシトクロムであるシトクロム  $c_2$  と高電位鉄イオウタンパク質 (HiPIP) の二つに大きく分けられ、いずれを電子伝達体として利用しているかは、種によって異なる。これまでの光合成反応中心の構造研究により、シトクロム  $c_2$  との電子伝達については多くの知見が得られているが、HiPIP と光合成反応中心の分子認識については、詳細な研究、とりわけ構造情報に基づいた研究についてはほとんど報告されていない。紅色イオウ細菌 *Thermochromatium* (*Tch.*) *tepidum* においては、HiPIP が光合成反応中心への電子伝達体として働いている。本研究ではこの光合成反応中心と HiPIP を取り上げ、X線構造解析の手法によりそれぞれの三次元構造を決定した。

また *Tch. tepidum* は、温泉より単離された好熱菌であり、紅色細菌としては最高温度である 58°C まで生育可能である。この *Tch. tepidum* 由来のタンパク質には耐熱性があり、光合成反応中心も膜小胞内にある状態で 70°C まで安定である。タンパク質の三次元構造に基づいた耐熱化機構の研究は、これまで可溶性タンパク質に限られており、膜タンパク質において同様の研究が行われた例はない。本研究では上記の電子伝達機構に加え、耐熱性光合成反応中心の三次元構造に基づいた膜タンパク質耐熱化機構についての検討も行った。

光合成反応中心については、*Tch. tepidum* の膜画分から界面活性剤  $n$ -オクチル- $\beta$ -D-グルコピラノシドによって可溶化して、PEG4000 および塩化ナトリウムを沈殿剤として用いることで結晶が得られた。放射光実験施設 SPring-8 において低温結晶解析の手法を適用して 2.2 Å 分解能の回折データが得られた。位相決定は分子置換法により行い、構造精密化の結果、 $R_{work}=23.1\%$ 、 $R_{free}=28.7\%$  の分子モデルを構築することができた。HiPIP については、*Tch. tepidum* の可溶性画分から精製し、結晶化を行った結果、硫酸アンモニウムを沈殿剤とする条件で結晶が得られた。データ測定は放射光実験施設 Photon Factory において行い、1.5 Å 分解能の回折データが得られた。分子置換法による位相決定の後、1.5 Å 分解能で  $R_{work}=21.2\%$ 、 $R_{free}=23.8\%$  まで分子モデルを精密化することができた。この HiPIP の結晶は非常に良質であり、低温結晶解析の手法によって、0.8 Å 分解能を越える回折点も観測されている。

光合成反応中心の結晶構造は、L, M, H, そしてシトクロムの 4 つのタンパク質サブユニットからなり、これらのうち L, M サブユニットが膜貫通領域を形成する。この膜貫通領域には、電荷分離の中心を担うバクテリオクロロフィル二量体を

初めとする補欠分子族が6種類保持されている。これらに加え、ペリプラズム側の膜表在性サブユニットであるシトクロムサブユニットには、4つのヘムが結合している。また本構造解析では、膜貫通領域の分子表面に、7つの界面活性剤分子および一つの脂質分子が結合していることも観測された。*Tch. tepidum* 由来の反応中心と中温菌由来の反応中心の一次構造を比較し、膜タンパク質における耐熱化機構を議論した。さらに、得られた光合成反応中心と HiPIP の結晶構造を用いて、それぞれの分子表面の電荷分布に基づいた結合部位の検討を行い、両者の間で起こる電子伝達反応の機構について議論した。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、好熱性紅色光合成細菌 *Thermochromatium* (*Tch.*) *tepidum* の光合成反応中心と高電位鉄イオウタンパク質 (HiPIP) を取り上げ、それぞれの三次元構造を X 線構造解析により決定したもので、その結果に基づき、膜タンパク質耐熱化機構および電子伝達における分子認識機構を議論している。

*Tch. tepidum* 由来の光合成反応中心については、界面活性剤を用いて可溶化して結晶化を行い、放射光を利用した低温結晶解析で測定したデータに基づいた分子置換法により、2.2 Å 分解能の精密構造を得るのに成功している。一方、HiPIP については、*Tch. tepidum* の可溶性画分から精製して結晶化し、同様に放射光を利用した回折データに基づき、分子置換法による位相決定で、1.5 Å 分解能の分子構造を得ている。HiPIP の結晶は低温結晶解析によって 0.8 Å 分解能を越える回折データ測定が可能なもので、さらなる超高分解能構造解析の可能性を示唆するものであった。

光合成反応中心の結晶構造は、その複合体構成成分がほぼ完全に決定されており、さらには膜貫通領域の分子表面に、7つの界面活性剤分子と1つの脂質分子の結合が確認されている。一次構造を比較したところ、*Tch. tepidum* 由来の反応中心には、他の中温菌由来のものに比べ、多くのアルギニン残基 (Arg L71, Arg L84, Arg M104) が存在していることが明らかにされ、これらのアルギニン残基は三次元構造上で、全て膜表在性領域と膜貫通領域の境界面、すなわち膜表層領域に位置していることが明らかにされた。膜表層に存在する塩基性のアミノ酸残基は、生体内においてはリン脂質頭部のリン酸基と強く相互作用することが予想され、このようにアルギニン残基が多く存在することは、この光合成反応中心と脂質二重層との親和性を高め、結果としてその耐熱性を高めることにも寄与すると考察している。また、結晶構造で確認されたリン脂質分子は塩基性アミノ酸残基と相互作用していることが明らかにされた。

さらに、*Tch. tepidum* 由来の光合成反応中心と HiPIP の結晶構造を用いて、それぞれの分子表面の電荷分布に基づいた結合部位の検討を行った結果、これら二つのタンパク質は、主に疎水性相互作用により分子認識を行うことが示唆された。また、光合成反応中心側の結合部位については、シトクロムサブユニットに存在する四つのヘムのうち、バクテリオクロロフィル二量体から最も遠くに位置するヘムの近傍であると結論している。一方、以前に構造解析された *Blastochloris viridis* 由来の光合成反応中心とシトクロム  $c_2$  の分子認識においては、静電的相互作用が重要な役割を果たすと考えられており、シトクロム  $c_2$  と HiPIP が全く異なる認識機構により、光合成反応中心と相互作用する可能性が示された。

以上に示した研究成果は、当該分野の進展に確かな寄与があるものであり、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分な価値があるものと認められた。また、本論文の研究内容とそれに関連した研究分野についての口頭試問を行った結果、合格と認めた。